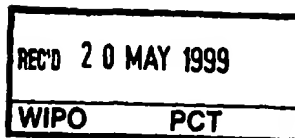


5/8

35



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

EPO - DG 1

10. 10. 2000

(54)

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 FEV. 1999

Pour le Directeur general de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone 01 53 04 53 04
Telecopie 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

30.1.98

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 01100-

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

30 JAN. 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE

158, rue de l'Université

75340 PARIS CEDEX 07

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

numéro

H507650/38-VT

01.44.18.89.00

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☒ demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Protéine humaine β -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de
dégradation par le protéasome"

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE

Forme juridique

Etablissement Public

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

101, rue de Tolbiac
75654 PARIS CEDEX 13

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Marie-Louise GILLARD

CPI n° 92-1099

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

En n° 7817 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux bases s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

BA 5-10 A/15196 H



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 01 100

TITRE DE L'INVENTION :

Protéine humaine β -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
101 rue de Tolbiac
75654 PARIS Cédex 13

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1/ BENAROUS Richard
19, rue Croulebarbe
75013 PARIS
FRANCE

2/ MARGOTTIN Florence
30, rue de Lourmel
75015 PARIS
FRANCE

3/ DURAND Hervé
20 ter, rue Damalouise
91850 BOURAY/JUINE
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 26 janvier 1999

Marie-Louise GILLARD
n° CPI 92-1099

La présente invention a pour objet une nouvelle protéine humaine, qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome. Cette protéine, dénommée h- β TrCP, est capable d'interagir notamment avec la protéine Vpu du virus HIV-1 ainsi qu'avec la

5 protéine cellulaire Skp1p.

Elle a également pour objet les fragments peptidiques de la protéine h- β TrCP qui ont conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine Skp1p.

Elle a également pour objet les séquences d'acides nucléiques codant

10 pour ladite protéine ou ses fragments peptidiques.

Elle concerne également l'utilisation desdites séquences d'acides nucléiques ou des protéines et fragments peptidiques correspondants pour le criblage d'agents antitumoraux ou d'agents antiviraux anti-HIV-1.

Elle concerne également l'utilisation de l'expression de la protéine

15 h- β TrCP ou de ses fragments peptidiques dans le domaine de la thérapie génique anti-infectieuse HIV-1 ou antitumorale.

Elle a également pour objet les vecteurs d'expression contenant lesdites séquences d'acides nucléiques et les microorganismes procaryotes ou les cellules eucaryotes, transformés avec lesdits vecteurs.

Enfin, elle a également pour objet des procédés de criblages d'agents

20 antitumoraux et d'agents antiviraux anti-HIV-1.

La protéine Vpu est une petite protéine membranaire de 81 acides aminés, exprimée par la plupart des isolats du virus HIV-1 mais ni par ceux du virus humain HIV-2 nettement moins pathogène, ni par ceux du virus simien SIV

25 (COHEN et al., Nature, 334, 532-534, 1988; et STREBEL et al., Science, 2, 1221-1223, 1988).

La protéine Vpu possède un domaine hydrophobe N-terminal, qui permet l'ancrage aux membranes cellulaires, et un domaine C-terminal hydrophile dirigé vers le cytoplasme. Sa structure est très similaire à celle d'autres protéines

30 membranaires de virus à ARN telles que la protéine M2 du virus *Inflenza* de la grippe (STREBEL et al., J. Virol, 63, 3784-379, 1989; HENKLEIN et al., Peptide Research, 6, 79-87, 1993). Une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) a mis en évidence la présence de deux hélices alpha au niveau du domaine

cytoplasmique de la protéine Vpu, encadrant une région flexible contenant deux sérines, sites de phosphorylation par la caséine kinase II (SHUBERT et al., J. Mol. Biol., 236, 16-25, 1994 ; WRAY et al., Int. J. peptide Protein Res., 45, 35-43, 1995).

5 On connaît à ce jour deux fonctions biologiques associées à la protéine Vpu. La première fonction de la protéine Vpu est liée à sa capacité à augmenter la production de particules virales à partir des cellules infectées par HIV-1 (STREBEL et al., 1988, 1989; *supra*). En l'absence de la protéine Vpu, la production de virions est largement diminuée (de 5 à 10 fois) (STREBEL et al.,
10 1988, *supra*) ; des agrégats de virus, des structures bourgeonnantes et des particules aberrantes apparaissent à la surface de la membrane plasmique tandis que se forment des particules intracytoplasmiques.

La deuxième fonction de la protéine Vpu est sa capacité à induire la dégradation de la protéine CD4, récepteur cellulaire du virus HIV-1, participant
15 ainsi à la diminution de l'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules (Willey et al., J. Virol. 68, 1207-1212, 1994).

De plus, il a été montré que les deux sérines de phosphorylation de la protéine Vpu, situées en position 52 et 56, étaient indispensables pour la dégradation de CD4 induite par Vpu (MARGOTTIN et al., Virology, 223, 381-
20 386, 1996). En outre, lors du processus d'infection par le virus HIV-1, en l'absence de la protéine Vpu, le précurseur d'enveloppe Gp160 et la protéine CD4 nouvellement synthétisée s'associent dans le réticulum endoplasmique, bloquant la maturation de la protéine Gp160 (BOUR et al., J. Virol., 65, 6387-6396, 1991). La dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est essentielle pour
25 libérer la protéine d'enveloppe virale qui est retenue dans le réticulum endoplasmique par sa liaison à CD4 grâce à l'interaction avec la sous-unité Gp120, et permettre la maturation normale de l'enveloppe vers la membrane plasmique et ultérieurement son intégration dans les particules virales, ce qui les rend infectieuses. Des études récentes ont mis en évidence le fait que la
30 dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est sensible aux inhibiteurs spécifiques du protéasome, organe présent dans la cellule, et est dépendante de la présence d'une "machinerie d'ubiquitination intacte" (FUJITA et al., J. Gen. Virol., 78, 619-625, 1997). En outre, il est connu que la dégradation de certaines protéines par le protéasome se fait par l'intermédiaire de médiateurs
35 cellulaires tels que Skp1p. BAI et al. (Cell, 86, 263-274, 1996) ont montré que la protéine Skp1p était nécessaire pour la protéolyse médiée par l'ubiquitine et que

cette dégradation se faisait grâce à l'interaction de Skp1p avec des protéines contenant un motif dénommé boîte F.

Ainsi, la protéine Vpu participe à des fonctions absolument critiques pour assurer la production de particules virales infectieuses en grand nombre, puisqu'elle intervient non seulement sur les produits du gène *gag*, c'est-à-dire sur les protéines de structure en augmentant le relâchement des particules virales mais aussi sur ceux du gène *env* en permettant la maturation de la protéine d'enveloppe suite à la dégradation du récepteur CD4. MARGOTTIN et al. 1996 (*supra*) ont montré que l'interaction entre Vpu et CD4 se faisait par l'intermédiaire de leur domaine cytoplasmique et que cette interaction n'était pas suffisante pour déclencher la dégradation du récepteur CD4.

La protéine Skp1p est une protéine cellulaire impliquée dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, lequel dépend de l'ubiquitinylation des protéines (PICKART C.M., The FASEB Journal, 11, 1055-1066, 1997). La dégradation des protéines par le protéasome est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires essentiels comme le contrôle de la prolifération cellulaire, le renouvellement des protéines et l'élimination des protéines incorrectement repliées, en particulier au niveau du réticulum endoplasmique (CIECHANOVER, A., Cell, 79, 13-21, 1994). De nombreux virus, comme le virus HIV-1 qui dégrade CD4 par l'intermédiaire d'une de ses protéines Vpu (TRONO D., Cell, 82, 189-1992, 1995), utilisent à leur profit ces voies cellulaires de dégradation des protéines.

La protéine Skp1p est un facteur essentiel de ciblage de protéines régulatrices du cycle cellulaire par le protéasome. Le ciblage de la dégradation de ces régulateurs est en particulier nécessaire à l'entrée du cycle cellulaire en phase S de synthèse d'ADN (PAGANO, M., The FASEB Journal, 11, 1068-1075, 1997). Des études récentes montrent que la protéine Skp1p, avec des protéines à boîte F sont les éléments essentiels de complexes de haut poids moléculaires appelés SCF pour "Skp1p-Cullin-F-box-protein complexes". Ces complexes SCF jouent le rôle d'enzyme E3 qui par leur activité ubiquitine-ligase permettent la dernière étape de l'ubiquitinylation de protéines substrats qui sont ainsi ciblées vers la dégradation par le protéasome (HOYT, A, Cell, 91, 149-151, 1997).

On a maintenant trouvé une nouvelle protéine humaine qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

En raison de l'homologie de cette nouvelle protéine avec la β TrCP de Xenope, protéine contenant des motifs β -transducine et connue en langue anglaise sous la dénomination "beta transducin repeats containing protein", la protéine de l'invention est dénommée h- β TrCP (human- β TrCP).

5 La protéine h- β TrCP de l'invention est capable d'interagir notamment avec la protéine Vpu et/ou la protéine Skp1p.

On a trouvé en effet que la protéine h- β TrCP interagit avec la protéine Skp1p ; elle fait donc partie d'un nouveau complexe SCF qui normalement est utilisé par la cellule pour la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire.

10 De plus, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, on a trouvé que la protéine h- β TrCP interagit également avec Vpu.

Par l'activité de ciblage vers les voies de dégradation par le protéasome, la protéine h- β TrCP, selon l'invention, joue le rôle de médiateur cellulaire de la protéine Vpu dans les cellules infectées par le virus HIV-1.

15 Sans pour autant vouloir se limiter à une théorie quelconque, on pense que, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, le virus utilise, par l'intermédiaire de la protéine Vpu, le complexe SCF, dont la protéine β TrCP fait partie pour induire la dégradation du récepteur CD4 qui va favoriser la réplication virale et le relâchement des virions infectieux.

20 La présente invention a donc pour objet une nouvelle protéine humaine, dénommée h- β TrCP, qui présente la SEQ ID No.2 et qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome par interaction avec la protéine Skp1p et/ou la protéine Vpu du virus HIV-1.

25 La protéine h- β TrCP possède 569 acides aminés et comporte une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- 30 - troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

Elle a aussi pour objet les fragments peptidiques de celle-ci résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine Skp1p.

5 L'invention concerne en particulier les fragments peptidiques qui comprennent l'une des séquences en acides aminés de h- β TrCP ci-après :

251-569,

292-569,

292-396,

10 292-545 et

1-291.

La présente invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques, à savoir les séquences d'ADN génomique, les séquences d'ADNc ou d'ARNm qui comprennent ou sont constituées par un enchaînement de nucléotides codant pour la protéine h- β TrCP ou pour l'un quelconque de ses fragments peptidiques tels que définis précédemment.

15 L'invention concerne notamment les séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine h- β TrCP et ses fragments peptidiques décrits ci-dessus qui sont représentées par :

- 20 a) les séquences d'ADNc SEQ ID No.1 codant pour ladite protéine h- β TrCP et des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique,
- 25 résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine h- β TrCP ou ses fragments ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de la protéine h- β TrCP ou des séquences d'acides nucléiques codant pour cette protéine ou pour ses fragments peptidiques pour le criblage :

- d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Vpu et/ou d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p
- d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou
- 35 des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines

tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p.

En effet, en perturbant les interactions Vpu/h- β TrCP et/ou Skp1p/h- β TrCP, on peut :

- 5 - soit inhiber la réplication et la production du virus HIV-1 par des cellules infectées ;
- soit inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire et avoir un effet antiprolifératif.

Par ailleurs, en modulant l'interaction Skp1p/h- β TrCP, on peut
10 augmenter la production de particules infectieuses produites par des vecteurs rétroviraux à base du génome de HIV-1 dans les lignées productrices de ces vecteurs et ainsi augmenter la production de ces vecteurs de thérapie génique.

On peut sélectionner les agents antiviraux soit à partir de banques aléatoires de peptides, à la surface de phages (SCOTT J. et al., Science, 249, 386-
15 390, 1990), soit en utilisant des oligonucléotides de synthèse aléatoires selon la technique de type SELEX (TUERK et GOLD, Science, 249, 505-510, 1990). Cette technique permet d'isoler à partir d'un pool très large d'oligonucléotides, ceux qui ont une grande affinité pour la protéine d'intérêt, dans le cas présent la protéine h- β TrCP. Ils sont dénommés aptamers. Parmi ces aptamers, on pourra
20 sélectionner ceux qui inhibent les deux interactions Vpu/h- β TrCP et Skp1p/h- β TrCP par le criblage ci-après.

Le criblage défini ci-dessus peut par exemple être réalisé en utilisant le système double-hybride en levure dans lequel des cellules de levure co-exprimant la protéine h- β TrCP selon l'invention et la protéine Vpu, ou la protéine Skp1p,
25 sont cultivées sur des milieux dépourvus d'histidine en présence de la substance à tester.

On peut également utiliser des variantes du système double-hybride, telles que le système triple-hybride décrit par TIRODE et al. (J. Biol. Chem., 272, 22995-22999, 1997), dans lequel un peptide inhibiteur de l'interaction peut être
30 exprimé comme troisième partenaire pour inhiber l'interaction des deux autres. Une banque de peptides aléatoires peut aussi être utilisée de la sorte. On peut aussi utiliser le système reverse-hybride décrit par VIDAL et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 10315-10320), dans lequel on sélectionne non pas pour une interaction mais contre une interaction. On peut dans ce système, comme dans le système double-
35 hybride classique, cribler des banques de petites molécules chimiques, y compris issues de la synthèse chimique, pour mettre les levures co-transformées avec les

vecteurs double-hybride ou reverse hybride porteurs des fusions avec la protéine Vpu, la protéine h-βTrCP ou la protéine Skp1p, en présence de ces petites molécules à la recherche d'un inhibiteur des interactions Vpu-h-βTrCP et Skp1p-h-βTrCP.

- 5 Ce criblage peut aussi être effectué *in vitro* en utilisant la protéine Vpu, ou la protéine Skp1p, et la protéine h-βTrCP, l'une des protéines étant immobilisée sur un support approprié et l'autre étant marquée par un moyen quelconque utilisé dans les moyens de détection de substances biologiques, ce moyen de marquage pouvant être par exemple un isotope radioactif, un agent luminescent, de la biotine
10 ou un anticorps spécifique.

L'une des protéines sera de préférence immobilisée sous la forme d'une protéine de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) sur des billes d'agarose-gluthation ou en plaques de microtitration, la GST servant d'agent de couplage de ladite protéine sur les billes ou sur les puits des plaques.

- 15 A cet effet, on peut utiliser notamment le test de scintillation à proximité (SPA) décrit par BOSWORTH et al. (Nature, 341, 167-168, 1989) et commercialisé par Amersham. Ce test consiste à marquer par un élément radioactif, par exemple le tritium, l'une des protéines et à immobiliser l'autre protéine sur des billes magnétiques ou sur des billes d'agarose-gluthation. L'effet
20 inhibiteur des substances à tester sur l'interaction des deux protéines (Vpu/h-βTrCP ou Skp1p/h-βTrCP) peut être facilement détecté sans séparation des espèces radioactives liées ou libres selon les protocoles décrits par BOSWORTH et al. (*supra*).

- On peut également utiliser la technique "Surface Plasmon Resonances" décrite par KARLSSON et al. (J. Immunol. Methods, 145, 229-233, 1991)
25 utilisant le Biacore commercialisé par Pharmacia, pour isoler les inhibiteurs de l'interaction entre la protéine Vpu et la protéine h-βTrCP selon l'invention ou les inhibiteurs de l'interaction entre la protéine Skp1p et la protéine h-βTrCP selon l'invention.

- 30 L'activité inhibitrice des agents antiviraux ainsi sélectionnés pourra être vérifiée par des tests sur des cellules T CD₄⁺ ou sur des chimpanzés infectés par les virus HTV-1 ou SIV Cpz.

- On peut également préparer les agents antitumoraux, ligands de la protéine h-βTrCP de l'invention, par les techniques double-hybride ou
35 apparentées ou par interaction *in vitro* avec des banques combinatoires de peptides ou autres, comme décrit précédemment. Ils peuvent également être choisis parmi

les agents antiviraux qui inhibent l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p décrits ci-après.

A titre d'agents antiviraux appropriés selon l'invention, on peut citer les fragments peptidiques de la protéine h-βTrCP qui ont conservé les propriétés d'interaction de la protéine h-βTrCP soit avec la protéine Vpu, soit avec la protéine Skp1p.

La présente invention a donc également pour objet les agents antiviraux anti-HIV-1 qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h-βTrCP de l'invention et qui sont dénués de la boîte F ou des motifs WD de sorte qu'ils ne peuvent plus interagir avec la protéine Skp1p ou la protéine Vpu, respectivement.

On peut encore citer, à titre d'agents antiviraux ou d'agents antitumoraux, des anticorps dirigés contre la protéine h-βTrCP de l'invention et ses fragments peptidiques, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

Ces anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus par le procédé bien connu de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975) ou des anticorps polyclonaux obtenus selon les procédés classiques d'immunisation d'animaux (Antibodies, a laboratory manual. E. Harlow & D. Lane. Cold Spring Harbor laboratory press, 1988).

On peut enfin citer comme agents antiviraux ou agents antitumoraux les oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h-βTrCP de l'invention qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques telle que définie précédemment, ce qui constitue également un autre objet de la présente invention.

Ces oligonucléotides antisens sont préparés par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites par AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York, 1989, Mises à jour jusqu'en 1997).

Les fragments peptidiques de h-βTrCP, qui possèdent la boîte F, peuvent être utilisés comme agents antitumoraux.

L'invention a également pour objet des animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h-βTrCP de l'invention ou des animaux transgéniques dans lesquels le gène βTrCP a été invalidé.

Ces animaux transgéniques ou invalidés pour le gène de la protéine h-βTrCP pourront servir de modèles d'étude *in vivo* de la perturbation du cycle cellulaire et de la prolifération par l'absence ou la surexpression du gène de la

protéine h- β TrCP ou de formes tronquées ou mutées de cette protéine, de la protéine Skp1p ou de la protéine Vpu.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites dans *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. & LACY, E. Cold Spring Harbor laboratory press, second edition, 1994.

L'invention a également pour objet les microorganismes procaryotes et les cellules eucaryotes transformés à l'aide d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN selon l'invention. Ce vecteur d'expression, qui peut être par exemple sous la forme d'un plasmide, doit comporter, outre la séquence d'ADN de l'invention, les moyens nécessaires à son expression, tels que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de réplication et de préférence un marqueur de sélection. La transformation des microorganismes et des cellules eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier qui pourra aisément déterminer, en fonction du microorganisme à transformer, les moyens nécessaires à l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention.

Le microorganisme préféré aux fins de l'invention est *E. coli* alors qu'on utilise de préférence *Saccharomyces cerevisiae* comme levure.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer notamment les cellules COS, CHO, SF9, Jurkat, etc., toutes étant répertoriées à l'ATCC.

L'invention a également pour objet les cellules eucaryotes co-transformées avec des vecteurs d'expression contenant d'une part la séquence d'ADN codant pour la protéine Vpu, ou bien celle codant pour la protéine Skp1p, et d'autre part une séquence codant pour la protéine h- β TrCP, lesdits vecteurs d'expression contenant de plus des moyens utiles à leur expression, y compris dans le système double hybride en levure.

Les protéines et fragments peptidiques selon l'invention peuvent être obtenus par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- culture d'un microorganisme transformé ou de cellules eucaryotes transformées à l'aide d'une séquence d'acides nucléiques selon l'invention et
- récupération de la protéine ou du fragment peptidique produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détail la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : *Recombinant DNA*

Technology I, Editors Ales Prokop, Rakesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, volume 646, 1991.

Ils peuvent également être préparés par les synthèses peptidiques classiques bien connues de l'homme du métier.

5 Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique et génie génétique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans SAMBROOK et al. (*supra*).

Par exemple, la synthèse des séquences d'ADNc selon l'invention peut être effectuée par amplification des ARNm de cellules humaines à l'aide de la
10 méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), comme décrit par exemple par GOBLET et al. (Nucleic Acid Research, 17, 2144, 1989) en utilisant des oligonucléotides synthétiques comme amorces, définis à partir de la séquence d'ADN SEQ ID No.1.

Le fragment d'acides nucléiques amplifié peut ensuite être cloné selon
15 les techniques décrites dans AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, chapter 3, *supra*).

L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

Une grande partie des techniques décrites dans ces exemples, bien
20 connues de l'homme du métier, est exposée en détail dans l'ouvrage de SAMBROOK et al. (*supra*) ou dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (*supra*).

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 à 5 sur lesquelles :

- la figure 1A est la photographie d'une boîte de Petri montrant la
25 croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Vpu_C + VBP1 ; Vpu_C + h-βTrCP ; Vpu_{C-2/6} + h-βTrCP ; Vpu_C ; h-βTrCP + Vpu_C et h-βTrCP + CD4_C sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;

30 - la figure 1B est la photographie d'un gel (Northern blot) montrant 3 ARNm de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 1C est la photographie d'une immunoempreinte (Western blot) montrant l'expression de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 2 donne les séquences de 4 protéines, h-βTrCP de
35 l'invention et βTrCP1 de *Xenopus*, Met30p de *Saccharomyces cerevisiae* et Scon2p de *Neurospora crassa* ;

- la figure 3 est la photographie d'un gel SDS-PAGE 15% montrant l'interaction entre Vpu_C et la protéine h-βTrCP de l'invention produite *in vitro* ;
- la figure 4 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant
5 Skp1p + h-βTrCP ; Skp1p + h-βTrCP-Δ7W ; Skp1p + VBP1 et Skp1p + CD4_C sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;
- la figure 5 est une représentation schématique de la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu présentant le réseau d'interactions décrit
10 précédemment.

Exemple 1 : Criblage double-hybride en levure / mise en évidence de la séquence d'ADNc de la protéine h-βTrCP et de la protéine h-βTrCP

Pour identifier les protéines cellulaires susceptibles d'interagir directement avec
15 la protéine Vpu, on a utilisé le système double-hybride en levure décrit par FIELDS et SONG dans Nature, 340, 245-246, 1989. Ce système double-hybride est basé sur la détection des interactions protéine-protéine par activation du gène rapporteur, His3 ou LacZ sous le contrôle de domaines de l'activateur transcriptionnel Gal4 dans la levure. Dans ce système, l'interaction entre les deux
20 protéines hybrides testées permet l'activation du gène His3 et la croissance des levures sans histidine d'une part, ainsi que l'activation du gène LacZ qui est révélée par une réaction colorimétrique spécifique de la β-galactosidase.

On a choisi comme cible le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu. On a procédé à la fusion des résidus d'acides aminés 28 à 81 de la protéine Vpu de
25 l'isolat LAI de HIV-1 avec le domaine de fixation de l'ADN de Gal4 (Gal4BD). La banque d'ADNc criblée était celle des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine, ATCC n°TIB 152) et elle a été fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4AD) dans le vecteur pGAD1318 (BENICHO et al. J. Biol. Chem., 269, 30073-30076, 1994).

30 Le clone de 1,3 kb qui a été isolé initialement par le système double-hybride (dénommé VBP1) code pour un ADN complémentaire partiel. Cet ADNc partiel code pour un fragment de 319 acides aminés correspondant au domaine C-terminal de la protéine h-βTrCP. Il contient sept motifs répétitifs suivis d'une queue C-terminale de 24 acides aminés. Ces motifs répétitifs, qui sont connus,
35 sont dénommés motifs WD parce que leur extrémité se termine habituellement par la séquence Trp-Asp (WD) (NEER et al., Nature, 371, 297-300, 1994). On notera

que les motifs WD, qui sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, sont généralement présents dans des protéines requises pour la dégradation protéique médiée par l'ubiquitine (GHISLAIN et al., *Embo*, 15, 18, 4884-4899, 1996).

5 Le clone ainsi isolé a été caractérisé par séquençage d'ADN sur séquenceur automatisé Applied Biosystem connu sous la dénomination ABI 373A. La technique de séquençage d'ADN est bien connue de l'homme du métier et est décrite notamment dans l'ouvrage SAMBROOK et al., "Molecular Cloning : a Laboratory Manual" Ed. Cold Spring Houbor Press, NY, 1989.

10 Une recherche dans les banques d'ADNc a montré que ce clone est l'homologue d'une séquence codant pour la protéine β TrCP de *Xenope* identifiée préalablement par SPEVAK et al. (*Mol. Cell. Biol.*, 13, 4953-4966, 1993).

L'ADNc complet (2,1 kb) de la protéine h- β TrCP, qui a la SEQ ID No. 1, a été obtenu par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) sur une préparation de plasmide correspondant à la banque d'ADN complémentaires de cellules Jurkat, 15 telles que définies précédemment, dans le vecteur pGAD1318.

En plus des sept motifs WD identifiés dans le fragment C-terminal, la protéine h- β TrCP entière selon l'invention possède un domaine N-terminal d'environ 250 acides aminés. Le fragment N-terminal contient un motif pour lequel un consensus 20 a été récemment défini sous le terme de boîte F et dont le rôle serait de cibler des protéines vers la machinerie de dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine grâce à l'interaction de protéines contenant cette boîte F avec la protéine Skp1p (BAI et al., 1996, *supra*).

25 Ainsi la protéine h- β TrCP, par ses motifs WD, est d'une part capable d'interagir avec la protéine Vpu, et d'autre part possède un motif boîte F qui interagit avec la protéine Skp1p et est donc capable de cibler les protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- β TrCP possède 569 acides aminés et comprend une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- 30 - boîte F : acides aminés 147-191,
 - premier motif WD : acides aminés 259-292,
 - deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
 - troisième motif WD : acides aminés 343-372,
 - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
 35 - cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
 - sixième motif WD : acides aminés 467-492,

– septième motif WD : acides aminés 516–544.

On a recherché si la protéine ainsi isolée avait une quelconque homologie avec des protéines déjà connues en utilisant la technique, bien connue de l'homme du métier, d'alignement des séquences selon le programme de MACAW (SCHULER et al., *Proteins : structure, function and genetics*, 9, 180–190, 1991).

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 qui montre que la protéine h- β TrCP a une homologie :

- de 88% avec la protéine α - β TrCP1 de *Xenopus*,
- de 33% avec la protéine Met30p de *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiteur de transcription impliqué dans la biosynthèse,
- de 31% avec la protéine Scon2p de *Neurospora crassa*.

La figure 2 montre également l'emplacement de la boîte F et des motifs WD.

Exemple 2 : Clonage de l'ADNc de la protéine h- β TrCP

L'ADNc de la protéine h- β TrCP ayant la SEQ ID N° 1 a été amplifié par PCR à partir de 2 μ g d'ADN du plasmide de la banque d'ADNc pGAD en utilisant deux tours d'amplification, le couple externe d'amorces pour le premier tour étant constitué de l'amorce sens A ayant la SEQ ID N° 3 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens B ayant la SEQ ID N° 4 (dans VPB1) et le couple interne d'amorces pour le deuxième tour étant constitué de l'amorce sens C ayant la SEQ ID N° 5 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens D ayant la SEQ ID N° 6 (dans VPB1).

A la suite de cette procédure, on a isolé un fragment de 1,4 kb, souscloné dans le plasmide pGAD-VPB1 sous la forme d'un fragment 5'SpeI–3'BglII, pour reconstituer le clone pGAD-h- β TrCP.

Les séquences codant pour VPB1 (résidus d'acides aminés 251 à 569 de la protéine h- β TrCP) ou codant pour la protéine h- β TrCP entière ont été sousclonées dans les vecteurs pGBT9, pGEX4T2 (Pharmacia) ou pCDNA3 (uniquement pour la protéine h- β TrCP) (Invitrogen) en utilisant des procédures standards.

Exemple 3 : Interaction spécifique de la protéine Vpu avec la protéine h- β TrCP

Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine h- β TrCP avec la protéine Vpu sont illustrés sur la figure 1.

3a- Interaction entre la protéine Vpu et la protéine h-βTrCP par le crible double-hybride décrit précédemment.

La figure 1A démontre l'interaction, par la technique double-hybride, de la région C-terminale de la protéine h-βTrCP (VBP1) issue de la banque d'ADNc de cellules Jurkat (ligne 1) ou de la protéine h-βTrCP entière (ligne 2) fusionnée au domaine d'activation de Gal4, avec le domaine cytoplasmique de Vpu fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou vice-versa (ligne 5). L'interaction se manifeste par l'activation des deux gènes rapporteurs His3 et LacZ ; le gène His3 permet la pousse des levures en l'absence d'histidine (panneau -His), et le gène LacZ induit la production de β-galactosidase manifestée par la coloration bleue en présence du substrat X-Gal (panneau β-Gal). Cette interaction est spécifique puisqu'elle n'est pas retrouvée entre la protéine Vpu et le vecteur seul (ligne 4), ou entre la protéine h-βTrCP et une autre protéine telle la région cytoplasmique de CD4 (ligne 6). Le panneau + His est un panneau contrôle qui montre que toutes les combinaisons, y compris lorsqu'il n'y a pas d'interaction, poussent en présence d'histidine.

Il faut noter que la protéine h-βTrCP n'interagit pas avec un mutant de la protéine Vpu inactif, Vpuc-2/6 (ligne 3), clone muté sur les deux résidus sérine Ser 52 et Ser 56, qui sont essentiels pour l'activité de Vpu (MARGOTTIN et al, 1996, *supra*). Ce résultat démontre qu'il y a corrélation entre la capacité de Vpu à interagir avec la h-βTrCP et son activité.

3b- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Northern Blot".

Par analyse "Northern Blot" d'ARNm de différentes lignées cellulaires humaines en utilisant une sonde 5', on a trouvé que plusieurs ARN messagers (ARNm) hybrident avec une sonde correspondant à h-βTrCP (Fig. 1B). Ces ARNm de tailles respectives 2,4 kb, 3,5 kb et 7 kb, sont retrouvés dans tous les tissus humains testés. Cette multiplicité d'ARNm est réminiscente de la situation décrite par HUDSON et al. (Dev. Genet., 19, 190-198, 1996) pour les ARNm de la βTrCP de *Xenope*, pour laquelle 3 ARNm différents de tailles respectives voisines de celles trouvées ici pour les ARNm de la h-βTrCP ont été rapportés.

3c- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Western Blot".

Des anticorps anti-peptidiques anti-h-βTrCP (Abs) ont été produits chez des lapins par immunisation avec le peptide de synthèse 275-293 correspondant au premier motif WD de la protéine h-βTrCP. Ces anticorps Abs ont été purifiés selon l'affinité par adsorption sur 30 µg de la protéine de fusion GST-VBP1,

exprimée chez *E. Coli* à partir du vecteur pGEX-VBP1 et immobilisée après électrobuvarpage sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps Abs purifiés ont ensuite été élués par l'éluant glycine.HCl, pH 3,0, neutralisés avec du tampon 1M TRIS, pH 8,0, et utilisés pour une analyse, par la technique de Western blot, de l'expression de la protéine h-βTrCP dans les cellules humaines Sup T1 (T1), dans les réticulocytes de lapins (RRL) et dans les lysats de membrane microsomique canine (CMM).

La Figure 1C montre l'expression de la protéine h-βTrCP détectée dans un lysat de cellules T humaines de la lignée Sup T1 (ligne 1), de réticulocytes de lapin de Promega (ligne 3), par la technique "Western blot" en utilisant les anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 275-293 obtenus précédemment. En revanche aucune protéine correspondant à la h-βTrCP n'a pu être détectée dans des membranes de microsomes de pancréas de chien de Promega (ligne 2). La taille de la protéine h-βTrCP détectée (60 kD) indique que le clone d'ADNc de h-βTrCP que nous avons caractérisé et qui est représenté sur la figure 2 est bien capable de coder pour la protéine h-βTrCP entière.

Exemple 4 : Cartographie des sites d'interaction entre Vpuc et la protéine h-βTrCP

Les sites d'interaction entre le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu (Vpuc) et la protéine h-βTrCP de l'invention ont été déterminés de la façon suivante.

Au niveau de Vpuc, il a été montré que la mutation des sérines aux positions 52 et 56 (clone Vpuc-2/6) abolissait intégralement l'interaction entre Vpu et h-βTrCP.

Au niveau de h-βTrCP, les résultats d'interaction double-hybride avec le domaine cytoplasmique de Vpu et les différents mutants décrits ci-après montrent que l'ensemble des motifs WD et la queue C-terminale sont requis pour une interaction optimale, comme indiqué dans le tableau ci-après.

Les mutants utilisés sont les suivants :

- VPB1-ΔW₁ (clone VPB1 dont le premier domaine WD a été délété ; résidus 292 à 569), qui correspondent à un fragment BglII-XhoI de VBP1,
- VPB1-ΔW₄₋₇ (clone VPB1 dont les domaines WD 4 à 7 ont été délétés ; résidus 292 à 396), et
- VPB1-ΔC-ter (clone VPB1 dont la queue C-terminale après le 7^{ème} domaine WD a été délétée ; résidus 292 à 545)

par PCR en utilisant respectivement l'amorce sens C, décrite précédemment, et les amorces antisens E et F suivantes dans VBP1.

Amorce E : SEQ ID N° 7







Amorce F : SEQ IND N° 8.

5 Le mutant h- β TrCP- Δ 7W (clone h- β TrCP dont les sept domaines WD ont été délétés ; résidus 1 à 291) a été construit en insérant un fragment SpeI-BglII à partir de la protéine h- β TrCP dans le vecteur pGAD1318 et le mutant β TrCP Δ F (résidus 32 à 179) a été obtenu par délétion du fragment AvrII-Asp718 de la protéine h- β TrCP avec conservation du cadre de lecture.

10 On a vérifié que l'interaction entre les protéines Vpu et h- β TrCP pouvait avoir lieu *in vitro* par le procédé suivant : les deux protéines ont été introduites dans du lysat de réticulocytes de lapins (RRL). Les complexes Vpu/ β TrCP formés *in vitro* ont été identifiés par co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-h- β TrCP dirigés contre le peptide 553-569, préparés par le même procédé
15 que celui utilisé pour obtenir les anticorps anti-h- β TrCP dirigés contre le peptide 275-293.

La figure 3 illustre l'interaction *in vitro* entre les protéines Vpu et h- β TrCP. La ligne 1 montre que la protéine Vpu n'est pas reconnue par l'antisérum anti-h- β TrCP, tandis que la ligne 5 montre qu'elle précipite en présence d'un
20 antisérum anti-Vpu. La ligne 2 montre que les anticorps anti-h- β TrCP sont capables de coprécipiter la protéine Vpu co-traduite *in vitro* avec la protéine h- β TrCP. La ligne 4 montre que le double mutant de Vpu muté sur les positions Ser52 et Ser56, incapable d'induire la dégradation de CD4, n'interagit pas avec la protéine h- β TrCP, et n'est donc pas coprécipité par des anticorps anti-h- β TrCP,
25 tandis que les lignes 6 et 7 montrent que ce mutant Vpu_{C-2/6} est traduit avec la même efficacité que la protéine Vpu.

TABLEAU

Mutants à délétion de h- β TrCP	Interaction avec Vpuc
h- β TrCP: 	+++
VBP1: 	+++
VBP1- Δ W1: 	-
VBP1- Δ C-ter: 	+
VBP1- Δ W4-7: 	+
h- β TrCP- Δ 7W: 	-

Exemple 5 : Interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p

Afin de démontrer que le motif boîte F était bien fonctionnel et pouvait donc
 5 effectivement servir au ciblage vers le protéasome par l'intermédiaire de la protéine Skp1p, on a réalisé un crible double-hybride entre le domaine N-terminal de la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p, ce qui a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p.

La protéine humaine Skp1p décrite dans BAI et al. (1996, *supra*) a été
 10 sousclonée dans le vecteur pLex10 pour une analyse d'interaction avec la protéine h-βTrCP dans la souche de levure L40 (VOJTEK et al. Cell, 74, 205-214, 1993).

La figure 4 illustre les résultats obtenus. La ligne 1 de la figure 4 montre tout
 d'abord que la protéine h-βTrCP interagit avec la protéine Skp1p. La ligne 2
 montre que le domaine N-terminal suffit à obtenir l'interaction, alors que la ligne 3
 15 montre que l'absence du domaine N-terminal de la protéine h-βTrCP dans VBP1 fait perdre toute interaction avec la protéine Skp1p. Ces résultats sont des arguments supplémentaires importants en faveur d'un rôle de la protéine h-βTrCP dans la dégradation médiée par la protéine Vpu du récepteur CD4, et également corroborent les résultats de FUJITA et al. (1997, *supra*) et de SCHUBERT et al.
 20 (1997, *supra*) montrant que la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu devrait avoir lieu dans le protéasome. Il est à noter que le domaine cytoplasmique de CD4 est incapable de se lier directement à la protéine Skp1 (ligne 4).

Exemple 6 : Modèle du réseau d'interactions impliqué dans la dégradation du récepteur CD4

La dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu est effectuée par le
 réseau d'interactions entre la protéine Vpu et le récepteur CD4, entre la protéine
 Vpu et les motifs WD de la protéine h-βTrCP et entre la boîte F de la protéine
 30 h-βTrCP et la protéine Skp1p, cette dernière interaction permettant le ciblage du complexe Vpu/CD4 vers le protéasome.

Ce réseau d'interactions est illustré schématiquement sur la figure 5.

C'est par l'intermédiaire d'un tel réseau d'interactions que la dégradation du
 récepteur CD4 par le protéasome via la protéine Vpu est provoquée.

35 La dégradation du récepteur CD4 permet la libération de la protéine d'enveloppe Gp160 et donc la libération du virus HIV-1 infectieux.

- Un des moyens pour empêcher le développement du virus HIV-1 chez le patient atteint consiste donc à empêcher la dégradation du récepteur CD4. Un des moyens pour empêcher cette dégradation au vu du procédé de dégradation ci-dessus consiste à rechercher des inhibiteurs, ou agents antiviraux anti-HIV,
- 5 inhibant l'interaction soit entre la protéine Vpu et la protéine h- β TrCP, soit entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p par les procédés décrits précédemment.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM
 (B) RUE: 101, Rue de Tolbiac
 (C) VILLE: PARIS
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75654 Cédex13

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Protéine humaine β TrCP de ciblage
 des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2151 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMENT: 70..1776

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TGCGTTGGCT GCGGCTGGC ACCAAAGGGG CGGCCCGGC GGAGAGCGGA CCCASTGGCC	60
TCGGCGATT ATG GAC CCG GCC GAG GCG GTG CTG CAA GAG AAG GCA CTC	108
Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu	
1 5 10	
AAG TTT ATG AAT TCC TCA GAG AGA GAA GAC TGT AAT AAT GGC GAA CCC	156
Lys Phe Met Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro	
15 20 25	
CCT AGG AAG ATA ATA CCA GAG AAG AAT TCA CTT AGA CAG ACA TAC AAC	204
Pro Arg Lys Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn	
30 35 40 45	
AGC TGT GCC AGA CTC TGC TTA AAC CAA GAA ACA GTA TGT TTA GCA AGC	252
Ser Cys Ala Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser	
50 55 60	
ACT GCT ATG AAG ACT GAG AAT TGT GTG GCC AAA ACA AAA CTT GCC AAT	300
Thr Ala Met Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn	
65 70 75	

GGC ACT TCC AGT ATG ATT GTG CCC AAG CAA CGG AAA CTC TCA GCA AGC Gly Thr Ser Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser 80 85 90	348
TAT GAA AAG GAA AAG GAA CTG TGT GTC AAA TAC TTT GAG CAG TGG TCA Tyr Glu Lys Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser 95 100 105	396
GAG TCA GAT CAA GTG GAA TTT GTG GAA CAT CTT ATA TCC CAA ATG TGT Glu Ser Asp Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys 110 115 120 125	444
CAT TAC CAA CAT GGG CAC ATA AAC TCG TAT CTT AAA CCT ATG TTG CAG His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln 130 135 140	492
AGA GAT TTC ATA ACT GCT CTG CCA GCT CGG GGA TTG GAT CAT ATC GCT Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala 145 150 155	540
GAG AAC ATT CTG TCA TAC CTG GAT GCC AAA TCA CTA TGT GCT GCT GAA Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu 160 165 170	588
CTT GTG TGC AAG GAA TGG TAC CGA GTG ACC TCT GAT GGC ATG CTG TGG Leu Val Cys Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp 175 180 185	636
AAG AAG CTT ATC GAG AGA ATG GTC AGG ACA GAT TCT CTG TGG AGA GGC Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly 190 195 200 205	684
CTG GCA GAA CGA AGA GGA TGG GGA CAG TAT TTA TTC AAA AAC AAA CCT Leu Ala Glu Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro 210 215 220	732
CCT GAC GGG AAT GCT CCT CCC AAC TCT TTT TAT AGA GCA CTT TAT CCT Pro Asp Gly Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro 225 230 235	780
AAA ATT ATA CAA GAC ATT GAG ACA ATA GAA TCT AAT TGG AGA TGT GGA Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly 240 245 250	828
AGA CAT AGT TTA CAG AGA ATT CAC TGC CGA AGT GAA ACA AGC AAA GGA Arg His Ser Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly 255 260 265	876
GTT TAC TGT TTA CAG TAT GAT GAT CAG AAA ATA GTA AGC GGC CTT CGA Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg 270 275 280 285	924
GAC AAC ACA ATC AAG ATC TGG GAT AAA AAC ACA TTG GAA TGC AAG CGA Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg 290 295 300	972
ATT CTC ACA GGC CAT ACA GGT TCA GTC CTC TGT CTC CAG TAT GAT GAG Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu 305 310 315	1020
AGA GTG ATC ATA ACA GGA TCA TCG GAT TCC ACG GTC AGA GTG TGG GAT Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp 320 325 330	1068

GTA AAT ACA GGT GAA ATG CTA AAC ACG TTG ATT CAC CAT TGT GAA GCA Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala 335 340 345	1116
GTT CTG CAC TTG CGT TTC AAT AAT GGC ATG ATG GTG ACC TGC TCC AAA Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys 350 355 360 365	1164
GAT CGT TCC ATT GCT GTA TGG GAT ATG GCC TCC CCA ACT GAC ATT ACC Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr 370 375 380	1212
CTC CGG AGG GTG CTG GTC GGA CAC CGA GCT GCT GTC AAT GTT GTA GAC Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp 385 390 395	1260
TTT GAT GAC AAG TAC ATT GTT TCT GCA TCT GGG GAT AGA ACT ATA AAG Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys 400 405 410	1308
GTA TGG AAC ACA AGT ACT TGT GAA TTT GTA AGG ACC TTA AAT GGA CAC Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His 415 420 425	1356
AAA CGA GGC ATT GCC TGT TTG CAG TAC AGG GAC AGG CTG GTA GTG AGT Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser 430 435 440 445	1404
GGC TCA TCT GAC AAC ACT ATC AGA TTA TGG GAC ATA GAA TGT GGT GCA Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala 450 455 460	1452
TGT TTA CGA GTG TTA GAA GGC CAT GAG GAA TTG GTG CGT TGT ATT CGA Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg 465 470 475	1500
TTT GAT AAC AAG AGG ATA GTC AGT GGG GCC TAT GAT GGA AAA ATT AAA Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys 480 485 490	1548
GTG TGG GAT CTT GTG GCT GCT TTG GAC CCC CGT GCT CCT GCA GGG ACA Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr 495 500 505	1596
CTC TGT CTA CGG ACC CTT GTG GAG CAT TCC GGA AGA GTT TTT CGA CTA Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu 510 515 520 525	1644
CAG TTT GAT GAA TTC CAG ATT GTC AGT AGT TCA CAT GAT GAC ACA ATC Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile 530 535 540	1692
CTC ATC TGG GAC TTC CTA AAT GAT CCA GCT GCC CAA GCT GAA CCC CCC Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro 545 550 555	1740
CGT TCC CCT TCT CGA ACA TAC ACC TAC ATC TCC AGA TAAATAACCA Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Il Ser Arg 560 565	1786
TACACTGACC TCATACTTGC CCAGGACCCA TTAAAGTTGC GGTATTTAAC GTATCTGCCA	1846
ATACCAGGAT GAGCAACAAC AGTAACAATC AAATACTGTC CCAGTTTCCC TGGACTAGCC	1906

GAGGAGCAGG GCTTTGAGAC TCCTGTTGGG ACACAGTTGG TCTGCAGTCG GCCCAGGACG 1966
 GTCTACTCAG CACAACAGAC TGCTTCAGTG CTGCTATCAG AAGATGTCTT CTATCAATTG 2026
 TGAATGATTG GAACTTTTAA ACCTCCCCTC CTCTCCTCCT TTCACCTCTG CACCTAGTTT 2086
 TTCCCATTTG GTTCCAGACA AAGGTGACTT ATAAATATAT TTAGTGTTTT GCCAGAAAAA 2146
 AAAAA 2151

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 569 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met
 1 5 10 15
 Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro Pro Arg Lys
 20 25 30
 Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Ala
 35 40 45
 Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Ala Met
 50 55 60
 Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn Gly Thr Ser
 65 70 75 80
 Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser Tyr Glu Lys
 85 90 95
 Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser Glu Ser Asp
 100 105 110
 Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys His Tyr Gln
 115 120 125
 His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe
 130 135 140
 Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn Ile
 145 150 155 160
 Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys
 165 170 175
 Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu
 180 185 190
 Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu
 195 200 205
 Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro Pro Asp Gly
 210 215 220

Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Lys Ile Ile
 225 230 235 240
 Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly Arg His Ser
 245 250 255
 Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly Val Tyr Cys
 260 265 270
 Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg Asp Asn Thr
 275 280 285
 Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg Ile Leu Thr
 290 295 300
 Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Arg Val Ile
 305 310 315 320
 Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp Val Asn Thr
 325 330 335
 Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala Val Leu His
 340 345 350
 Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys Asp Arg Ser
 355 360 365
 Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr Leu Arg Arg
 370 375 380
 Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys Val Trp Asn
 405 410 415
 Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His Lys Arg Gly
 420 425 430
 Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser Gly Ser Ser
 435 440 445
 Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala Cys Leu Arg
 450 455 460
 Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg Phe Asp Asn
 465 470 475 480
 Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys Val Trp Asp
 485 490 495
 Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr Leu Cys Leu
 500 505 510
 Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu Gln Phe Asp
 515 520 525
 Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser His Asp Asp Thr Ile Leu Ile Trp
 530 535 540
 Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro Arg Ser Pro
 545 550 555 560

Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg
565

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAAACTGCG TATAACGCG

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTGAATCAA CGTGTTCAGC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGATGATGTA TATAACTATC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TTTATCCCAG ATCTTGATTG TGTTG

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCAGGATCCT TATACAACAT TGACAGCAGC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCAGGATCCT TAGTCCCAGA TGAGGATTG

29

REVENDEICATIONS

1. Protéine humaine β TrCP (h- β TrCP) de ciblage des protéines vers les
voies de dégradation par le protéasome, caractérisée en ce qu'elle a la
5 SEQ ID No.2.

2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable
d'interagir avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et avec la protéine cellulaire
Skp1p.

3. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en
10 ce qu'elle comporte les motifs ci-après :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- 15 - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

4. Fragments peptidiques de la protéine selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 3 résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement
d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé
l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine
Skp1p.

5. Séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine humaine h- β Trcp et
25 les fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,
caractérisée en ce qu'elle est constituée par :

- a) la séquence d'ADN SEQ ID No.1 et des fragments d'acides nucléiques codant
pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences
30 ci-dessus ou un de ses fragments ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique,
résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine humaine
h- β Trcp ou les fragments de celle-ci ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

35 6. Utilisation de la protéine h- β TrCP ou des fragments peptidiques selon
l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antiviraux

anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Vpu.

7. Utilisation de la protéine h- β TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p.

8. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Vpu.

9. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p.

10. Utilisation de la protéine h- β TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p.

11. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5, pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- β TrCP et la protéine Skp1p.

12. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- β TrCP selon la revendication 4 dénués de la boîte F.

13. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- β TrCP selon la revendication 4 dénués des motifs WD.

14. Anticorps dirigés contre la protéine h- β TrCP ou les fragments peptidiques tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 4.

15. Oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- β TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5.

16. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- β TrCP selon la revendication 4, qui possèdent la boîte F.

17. Animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- β TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

18. Animaux transgéniques dans lesquels le gène BTrCP a été invalidé.
19. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5 et les moyens nécessaires à son expression.
- 5 20. Microorganismes ou cellules hôtes transformés par un vecteur d'expression selon la revendication 19.
21. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Vpu et un vecteur d'expression selon la revendication 19.
- 10 22. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Skp1p et un vecteur d'expression selon la revendication 19.

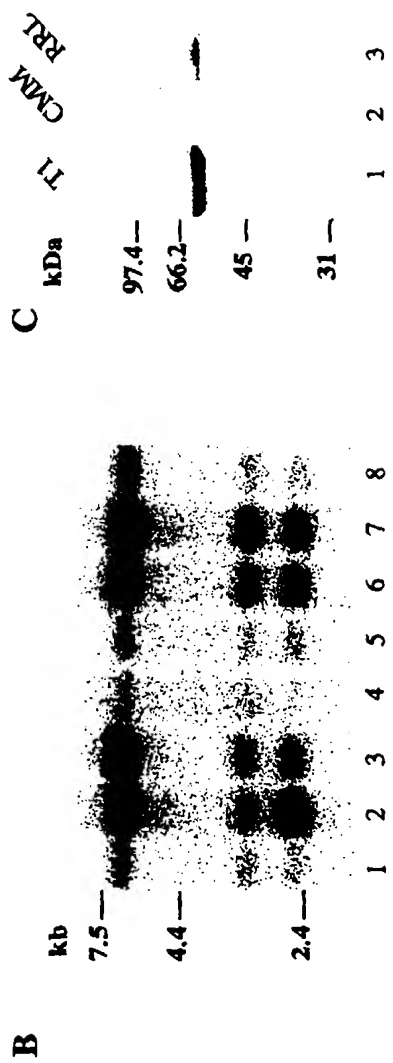
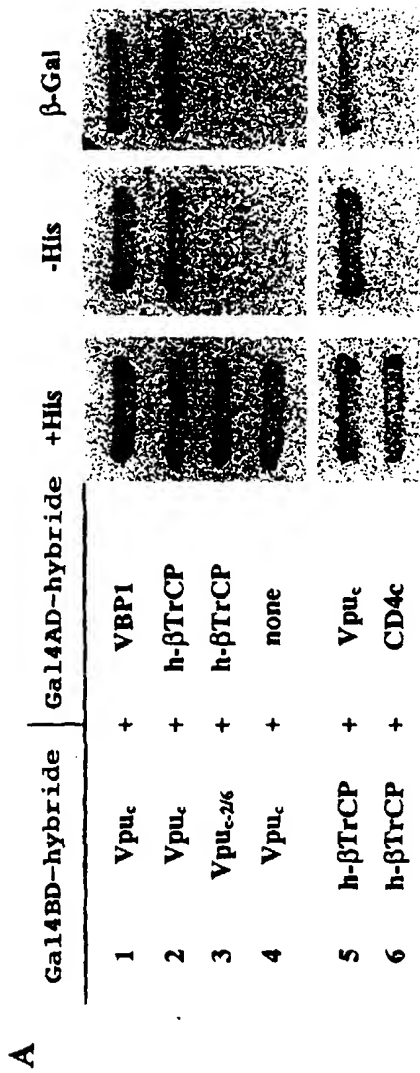


Figure 1

 DPABAVTQEKALKPFM-----SSEREDCNGGEPFKI 33
 MEGFSCSLQPPT-----ASEREDCNRDEPPFKI 28
 MRRERQRMMSFEDKDKDDLNSNSMNSSEMTDTAMPPLKRLLITGSSDPLAQGSSGPKK 60
 MSSVLMSKTVTPFLREHIPSIIYAPIGKPGNQETARAENPN----- 40

 HPEKNSLRQTYNSCARCLNQETVCLASTAMKTENCVAKTKLANGTBSMIVPKQR----- 88
 ITE-----KNTLRQTKLANGTBSMIVPKQR----- 53
 ITMATRSPSSSPDLATNDSGTRVQPLPEYNFTKFCYRBNPDIOFSPHTACYGDLKRTQ 120
 -----SKYCYRHPD-----GKCRRAADKAKMV 63

 -----KLSASYHEKELCVKYFEQWSESDQVEFVEHLISQCH 126
 -----KLSANYHEKELCVKYFEQWSESDQVEFVEHLISQCH 91
 EINANIAKLPLQEQSDIHIIISQYNSNNDHIRKILDLGILSTCFPLSYSSVTHM-- 178
 MIQSELDKLTSAQQAVTHVWSLFSAPARHEDMLQILSQLCFPLSFTSREVNEA-- 121

 F-BOX
 YQHGHSINYLKPMQLORDFITALDARGLDHIAENILSYLDAKSLCAELVQKEXYRVTSQG 186
 YQHGHSINTYLKPMQLORDFITALDARGLDHIAENILSYLDAKSLCAELVQKEXYRVTSQG 151
 -----IKIDFISILQOE-----LSLKLSYLDLQCSLQNAITRVQKQKLLADD 221
 -----EKIDFISALEVE-----LAQKVLGYLDVSTKBAQSQVRKQKLLADD 164

 MLKCKLIIRMVRTDLSWRGLAERRGWCQYIFXNKPPDGNAPPNSFYRALYPKIIQDIET- 245
 MLKCKLIIRMVRTDLSWRGLAERRGWCQYIFXNKPPDGTTPNSFYRALYPKIIQDIET- 210
 RVMYVNCQOHI-----DRKCPNCGWGLPLLMH-----RARIQONS TGSSGNADIQTQT--- 270
 AYVVMKQOHI-----NRKCTKCGWGLPLLEPKKLRNYTRQRLAQGGPOGRVTEIADS 218

 -----IES 248
 -----IES 213
 -----TRPWKVIYRERFKYES 286
 HDSQDRSNVQHGKRPAAAEAEEDPIKQRQMAAAEASKAVTQPKTRSWKAVYRDRWQVSY 278

 WD-1
 NWRGSRHSLQRTHCRSETSKGVYCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 308
 NWRGSRHSLQRTHCRSETSKGVYCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 273
 NWRGSRHSLQRTHCRSETSKGVYCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 343
 NWRGSRHSLQRTHCRSETSKGVYCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 335

 WD-2
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 368
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 333
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 403
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 395

 WD-3
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 368
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 333
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 403
 SVLCLQDDQKIVSGLRDNITIKIWDQVILECKRILTHGTG 395

 WD-4
 IAVNVMASPTDITLRRVLVGHRAAVNVVDFDDKYIVSASGORTIKVNTSCEFYRTLN- 427
 IAVNVMASPTDITLRRVLVGHRAAVNVVDFDDKYIVSASGORTIKVNTSCEFYRTLN- 392
 VKNVHVSRCYVLRGHTWVNCV-----LHPKSCFCSGDTTHRAKIDPNSCLKVFRG 461
 VKIFDFNSKETVCLGHSQDWNVSTH-----VLIKSRTVFSASDTTHKIDPNSCLKVFRG 453

 ----- 427
 ----- 392
 HVGQVQKILPLTIKQVE-----NLATDNTSDG 488
 HVGHVQVQVILPPEYEPDEEVLNGASQDNQDAMSVSSGSGSPSMASHAQIERAGSPGSHS 513

 WD-5
 GHKRGIACTLRVLLVSGSSDNTIRLWDIECCALRV 465
 GHKRGIACTLRVLLVSGSSDNTIRLWDIECCALRV 430
 SSPQDDPTMTDGADESDTSPNEQETVLDEINPETH-LLSCGLDHTIKVWDVKTGKILRT 547
 SSHNLLPSSLPSGDEDVRLHLYGSFVADESRLPPSYMTGGLDSD-RUNDSATGCLRT 573

 WD-6
 LFGHEELVRCIRFDMKRIYSGAYDGGIKKVVWDLVAALDPRAPAGTLCIRTLVHSGRVRFL 525
 LFGHEELVRCIRFDMKRIYSGAYDGGIKKVVWDLVAALDPRAPAGTLCIRTLVHSGRVRFL 490
 QFGHVEGVWDLVAALDPRAPAGTLCIRTLVHSGRVRFL 607
 LFGHEELVRCIRFDMKRIYSGAYDGGIKKVVWDLVAALDPRAPAGTLCIRTLVHSGRVRFL 619

 WD-7
 QFDEPOIVSSSHDDTILINWFLNDPAAQAEPPSPSRSTYISR 569 h-βTrCP
 QFDEPOIVSSSHDDTILINWFLNDPAAQAEPPSPSRSTYISR 518 x-βTrCP1
 KVAPIAQICIGDSFCFSGDEGCVMKYKFDLND 640 MET30
 ---PVTQGLSOSIMASGSDGTIRLHSPKPCRO 650 SCON2

Figure 2

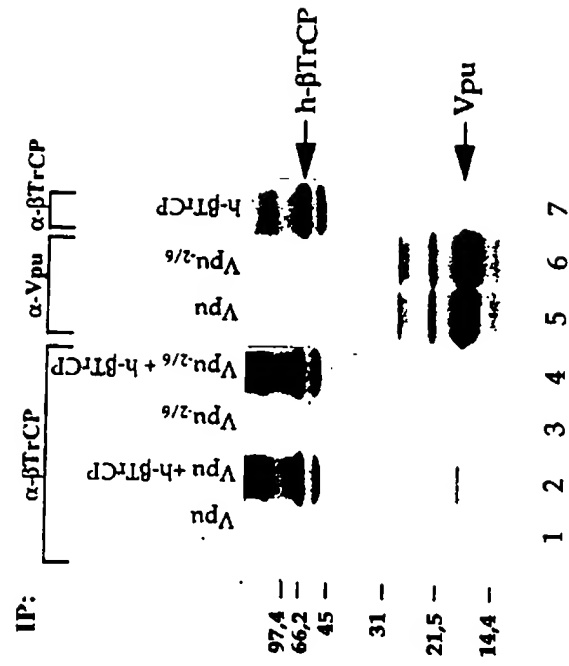


Fig 3

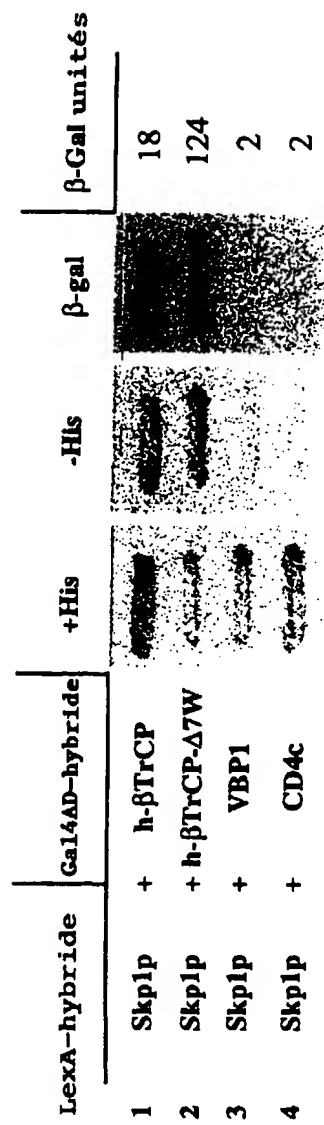


Figure 4

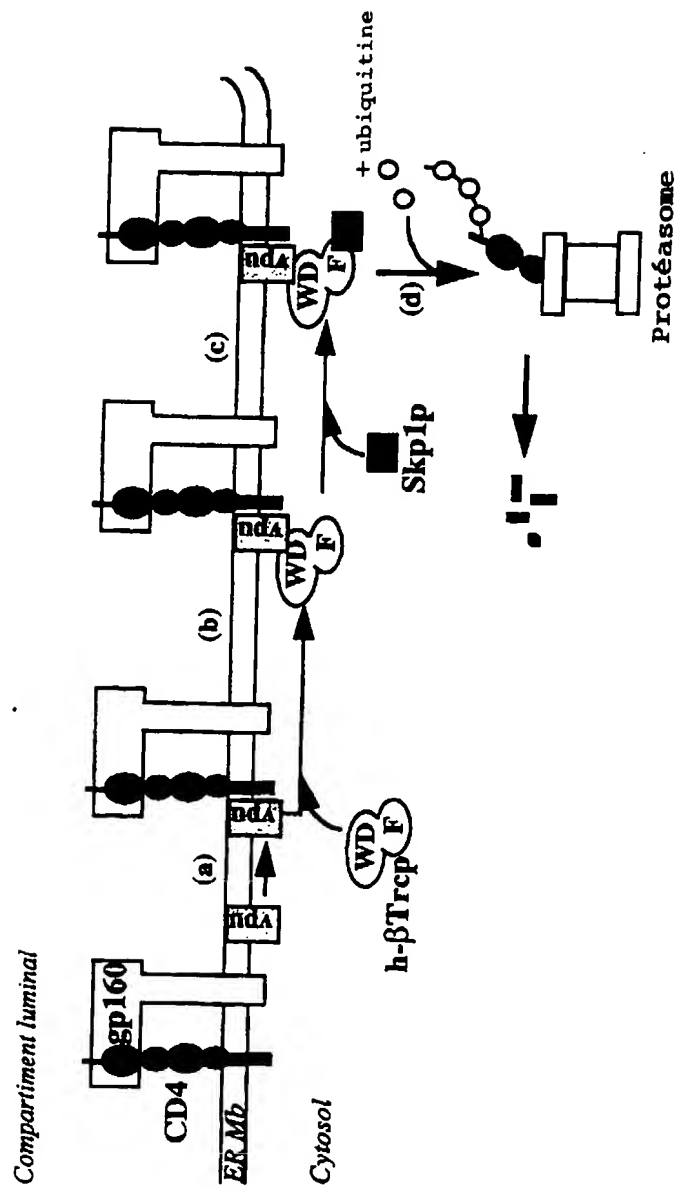


Figure 5